

Unidad de Microbiología.
Departamento de Biotecnología ETS Ingenieros Agrónomos.
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas.
Universidad Politécnica de Madrid.



Diversidad fenotípica y molecular de bacterias endosimbióticas de *Lupinus mariae-josephi*.

David Durán Wendt



II Reunión Microambiente
La Cristalera, Octubre 2010

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
Y GENÓMICA DE PLANTAS



Lupinus mariae-josephi (**Lmj**), es un lupino recientemente descrito, que a diferencia de otras especies de *Lupinus* tiene la capacidad de crecer en suelos calizos y alcalinos (terra rossa), $\text{pH} \geq 8$, alto contenido en carbonato de calcio.

Lupinos de la Península Ibérica:
(suelos preferentemente ácidos)

<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>
<i>L. Gredensis</i>	<i>L. hispanicus</i>
<i>L. cosentinii</i>	<i>L. micranthus</i>
<i>L. albus</i>	<i>L. polyphyllus</i>

Lupinus mariae-josephi (Pascual, 2004).



Lmj constituye un endemismo reducido a ciertas áreas de la comunidad valenciana (Llombai, Xàtiva, Montserrat y Gandía).



Aislamientos de bacterias endosimbióticas de *L. mariae-josephi*.

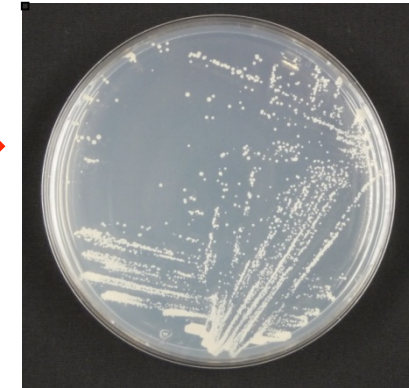
Montserrat
Llombai
Xàtiva
Gandía



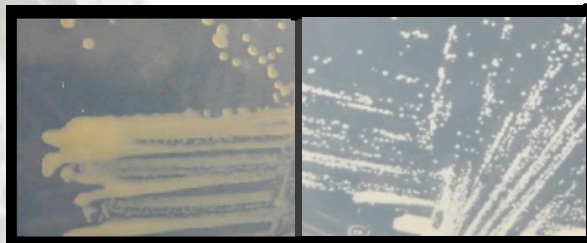
Plantas trampa de *L. mariae-josephi*



1 - 10 nodulos por planta

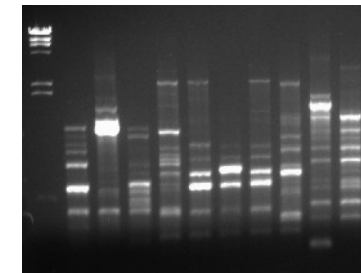


50 aislamientos



B. japonicum USDA110

Cepas Lmj
Bacterias de
crecimiento extralento.



PCR-RAPDs
19 perfiles diferentes
(**cepas Lmj**)

Ensayo de inoculación cruzada

Huesped	Cepas <i>Lupinus mariae-josephi</i>				
	LmjA2	LmjB2b	LmjC	LmjD2b	LmjH2p
□ <i>Lupinus mariae-josephi</i>	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺
□ <i>L. angustifolius</i>	No	No	No	No	No
<i>L. luteus</i>	No	No	No	No	No
<i>L. hispanicus</i>	No	No	No	No	No
<i>L. gredensis</i>	No	No	No	No	No
<i>Ornithopus compressus</i>	No	No	No	ND	No
□ <i>L. micranthus</i>	Fix ⁺	No	Fix ⁺	No	Fix ⁺
<i>L. cosentinii</i>	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	No	Fix ⁺
<i>L. albus</i>	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺
□ <i>Vigna sinensis</i>	Nod ⁺	Nod ⁺	Nod ⁺	Nod ⁺	Nod ⁺
□ <i>Macroptilium atropurpureum</i>	No	No	Fix ⁺	ND	No



L. mariae-josephi / cepas Lmj



LmjC nodules

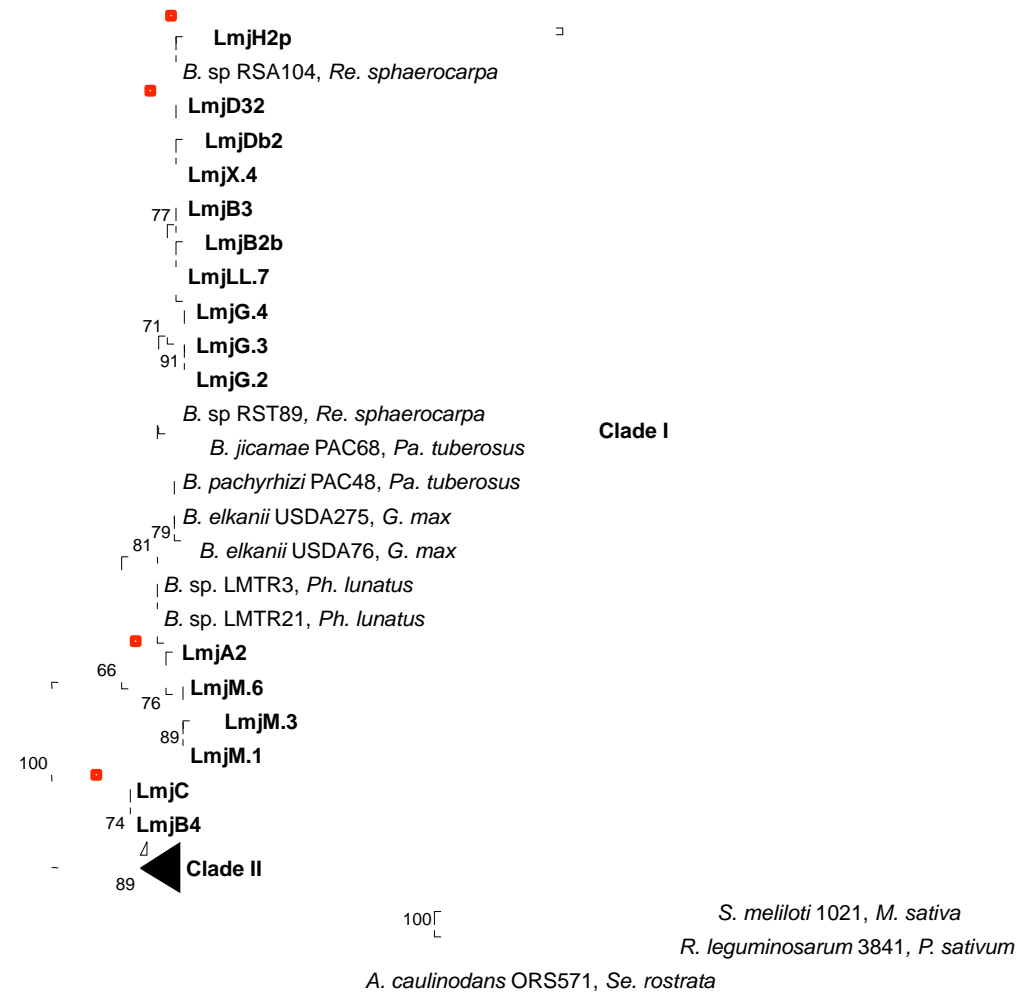


L. angustifolius / cepas Lmj



Vigna sinensis / cepas Lmj

Análisis filogenético basado en 16S rRNA (Maximun Likelihood)

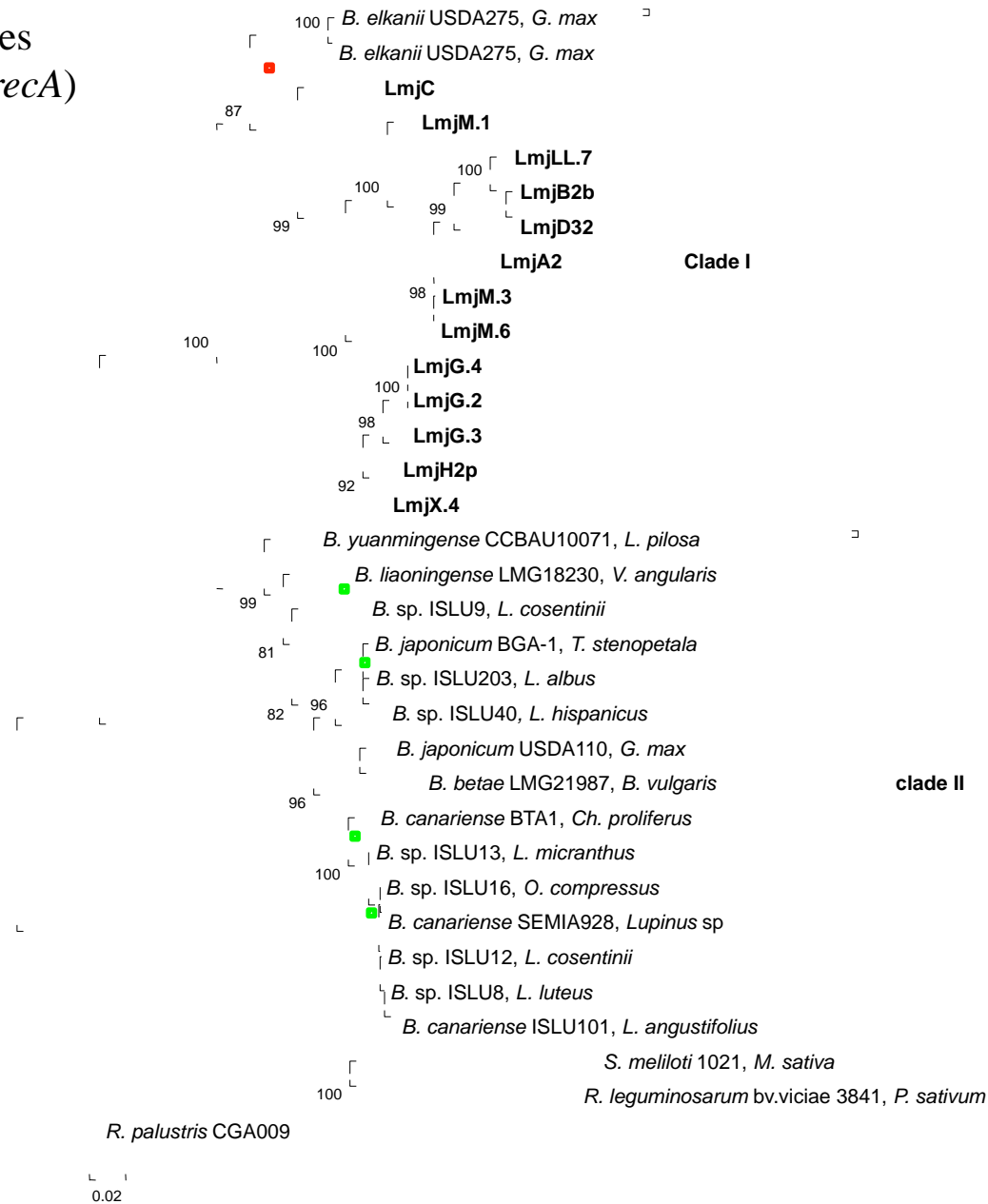


Bosea thiooxidans DSM9653

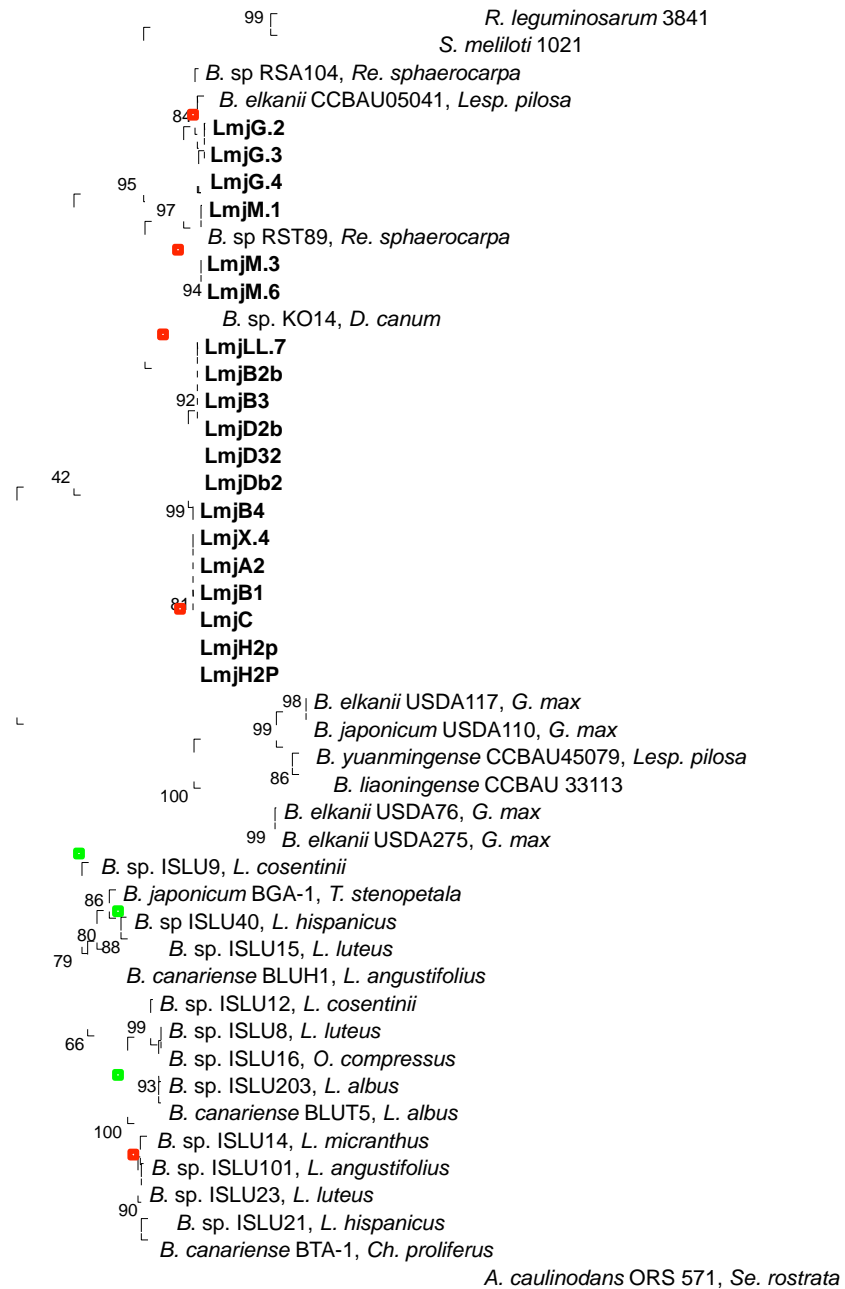
0.01

Clade II incluye: *B. japonicum* USDA110, *B. canariense* BTA-1, *B. betae*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense* y todos los aislamientos (cepas ISLU) de otros lupinos.

Análisis filogenético de genes concatenados (*glnII* + *atpD* + *recA*)



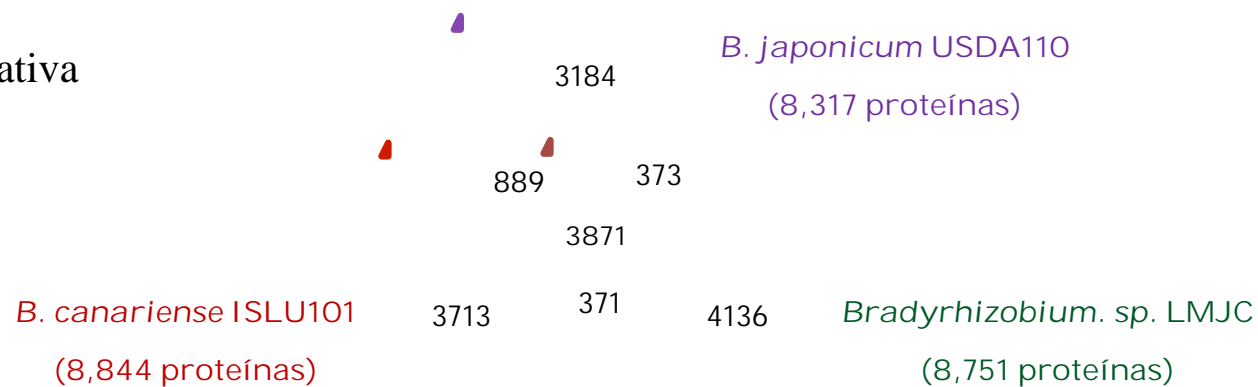
Análisis filogenético basado en *nodC* (Maximun Likelihood)



Comparación de los genomas secuenciados en relación con *B. japonicum* USDA110

Características del Genoma	<i>Bradyrhizobium canariense</i> ISLU101	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LmjC	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110
Tamaño	8,3 Mb	8,3 Mb	9,1 Mb
Contenido en GC	61%	59,85%	64%
Numero de genes	8900	8901	8370
Porcentaje codificante	76%	75%	86%
Numero de proteínas	8844	8751	8317
Orígenes de replicación	2	1	1

Genómica comparativa

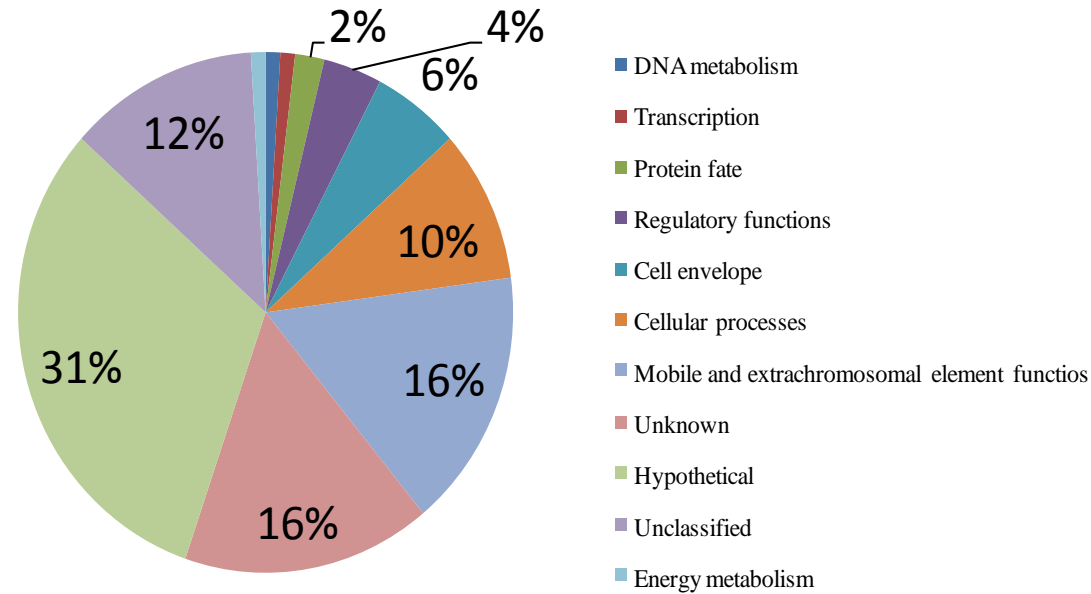


Características del plásmido (pISLU101)

Categorías generales	
Tamaño (aproximado)	110kb
Numero de genes	105
Porcentaje codificante	73.27%

Homología	
cepas	% lecturas con homología
<i>Bradyrhizobium</i> sp BTAi1	44,76%
<i>B. japonicum</i> USDA110	10,47%
Otras 18 especies	47,14%

Categorías funcionales



Genes implicados en nodulación.

Cepas	cluster		
	<i>nod</i>	<i>fix</i>	<i>nif</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. LmjC	único , la especie con mayor grado de similitud varia con respecto a cada gen analizado.	1º copia similar al de <i>B. japonicum</i> USDA110 2º copia similar a la de <i>S. meliloti</i>	similar al de <i>B. japonicum</i> USDA110
<i>B. canariense</i> ISLU101	similar al de <i>B. japonicum</i> USDA110	similar al de <i>B. japonicum</i> USDA110	similar al de <i>B. japonicum</i> USDA110

Sistemas de secreción.

Cepas	Sistemas de secreción		
	SSIII	SSIV	SSVI
<i>Bradyrhizobium</i> sp. LmjC	similar a USDA110	único, la especie mas parecida no es un <i>Bradyrhizobium</i>	-
<i>B. canariense</i> ISLU101	-	similar al plasmidico de BTAi1	1º copia similar a los de <i>B. japonicum</i> USDA110 2º copia similar a los de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841



■ Conclusiones

■ Las bacterias endosimbióticas aisladas de *Lupinus mariae-josephi* (extralentas) se agrupan filogenéticamente en un nuevo “clade” dentro del género *Bradyrhizobium*, que se diferencia de un segundo clade que incluye las especies actualmente definidas y, singularmente, de las bacterias aisladas de otros lupinos de la Península Ibérica.

■ Al igual que en otros genomas de *Bradyrhizobium* secuenciados, *B. canariense* ISLU101 y *Bradyrhizobium* sp LmjC poseen grandes genomas, con un alto número de genes únicos.

■ Los datos preliminares obtenidos señalan que *B. canariense* ISLU101 contiene un segundo replicón (~100 genes) con una elevada identidad de secuencia con *Bradyrhizobium* sp. BTai1.

■ Los genes *nod* de *B. canariense* ISLU101 y *Bradyrhizobium* sp LmjC presentan una organización génica muy conservada respecto a *B. japonicum* USDA110.

■ Los genes *fix* de *B. canariense* ISLU101 presentan una organización similar a la de *B. japonicum* USDA110. *Bradyrhizobium* sp LmjC posee una copia de genes similar a la de *B. japonicum* USDA110 y otra incompleta relacionada con *S. meliloti*.

■ *Bradyrhizobium* sp LmjC posee Sistemas de Secreción tipo III y IV. *B. canariense* ISLU101 no contiene SS tipo III y posee un SS tipo IV homólogo al de *Bradyrhizobium* sp BTai1, y dos copias del SS tipo VI, una homóloga a la de *B. japonicum* USDA110 y otra a *R. leguminosarum* bv. Viciae 3841.

Gracias por su atención.



IFAPA Las Torres-Tomejil. Alcalá del Rio (Sevilla)

Francisco Temprano

Centro de Investigación y Experimentación

Forestal Quart de Poblet (Valencia)

Albert Navarro

▣

Esta investigación es financiada por la Fundación BBVA.